



Differential contribution of Gata1 gene hematopoietic enhancer core during erythroid development

著者	鈴木 未来子
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 4770, 2008.3.25 Includes supplementary treatises Includes bibliographical references
発行年	2008
その他のタイトル	Gata 1 遺伝子血球系制御領域の赤血球分化段階特異的な機能解析
URL	http://hdl.handle.net/2241/110962

氏 名 (本籍)	鈴 木 未 来 子 (東 京 都)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4770 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Differential contribution of <i>Gata1</i> gene hematopoietic enhancer core during erythroid development (<i>Gata1</i> 遺伝子血球系制御領域の赤血球分化段階特異的な機能解析)		
主 査	筑波大学教授 (連携大学院)	理学博士	石 井 俊 輔
副 査	筑波大学教授	医学博士	二 宮 治 彦
副 査	筑波大学准教授	医学博士	小 島 寛
副 査	筑波大学講師	獣医学博士	國 田 智

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目 的)

転写因子 GATA-1 は赤血球に発現しており、赤血球への系列決定やその後の分化の進行に必要であることが報告されている。GATA-1 の発現量は赤血球分化の進行に伴い、大きく変化する。GATA-1 の発現は共通骨髄前駆細胞から始まり、巨核球・赤血球前駆細胞、赤血球バースト形成ユニット (BFU-E)、赤血球コロニー形成ユニット (CFU-E) と分化が進むにつれて、増加する。CFU-E から前赤芽球へ移行する段階で、発現はピークとなり、その後の赤芽球では減少する。GATA-1 ノックアウト細胞、ノックダウン細胞および野生型細胞との比較から、GATA-1 の発現量によって活性化または抑制する標的遺伝子が異なるという報告がなされている。このことから、各赤血球分化において、GATA-1 の量は厳密に調節されていると考えられるが、その制御機構はよくわかっていない。そこで本研究では、各赤血球分化段階に特異的な *Gata1* 遺伝子の制御機構を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

すべての分化段階において *Gata1* 遺伝子の発現を完全に再現できるレポーターマウスを作製するために、*Gata1* 遺伝子を中央付近に含む 196kb の大腸菌人工染色体 (BAC) クローンの *Gata1* 遺伝子翻訳開始点下流に GFP レポーターを相同組換えによって挿入したトランスジーンを用いて、マウス (以下 G1BAC-GFP マウス) を作製した。このマウスは、トランスジーンが挿入された位置に関わらず、内在性 *Gata1* 遺伝子の発現を忠実に再現できた。

(結 果)

以前の研究から、すでに *Gata1* 遺伝子のエンハンサーとしていくつかの領域が同定されている。しかしながら、以前の研究は分化後期である赤芽球を用いて行われたものであり、これらのエンハンサーが分化初期にも重要であるのかは、よくわかっていない。そこで私は G1BAC-GFP マウスを用いて、既知のエンハンサーのひとつである *Gata1* gene hematopoietic enhancer (G1HE) について、各分化段階での貢献を検討した。G1HE を欠失させたレポーターマウス (以下 ΔG1HE マウス) および、ヒトとマウスの間で高度に保存され

ている G1HE (1.3kb) 内部の 235bp 領域 (G1HE core) のみを欠失したマウス (以下 ΔG1HE core マウス) を作製し, BFU-E, CFU-E および赤芽球における GFP の発現を観察した。ΔG1HE マウスと ΔG1HE core マウスの表現型はほぼ一致していた。以前の報告の通り, 赤芽球での発現は著しく減少しており, コントロールマウスの約 20% であった。さらに, BFU-E における発現も検出限界以下に著しく減少していた。しかしながら, CFU-E ではコントロールの 50% の発現が残っていた。このことから, G1HE core はすべての分化段階で Gata1 遺伝子の活性化に重要であるが, 特に BFU-E と赤芽球では必須であることが示唆された。また, CFU-E では G1HE core 以外のエンハンサーが活性化に寄与していることがわかった。G1HE core 内部にはヒトとマウスの間で保存された GATA 結合配列が存在する。そこで, この GATA 結合配列に変異を入れたレポーターマウス (以下 GATAmut マウス) を作製し, 同様に解析したところ, GATAmut マウスの BFU-E, CFU-E および赤芽球における GFP の発現は ΔG1HE マウスおよび ΔG1HE core マウスの表現型と一致していた。このことから, G1HE core のエンハンサー活性には GATA 結合配列が必要であることがわかった。

GATA-1 ノックダウン ES 細胞は CFU-E より先に分化できないという報告があり, GATA-1 が CFU-E から赤芽球への分化に重要であるということがわかっている。しかしながら, G1HE core が積極的に発現を上げている BFU-E において GATA-1 が何の役割をしているのかについては, よくわかっていなかった。そこで, 発現を野生型の 5% まで落とした GATA-1 ノックダウンマウスに G1BAC-GFP レポーターをのせて, BFU-E および CFU-E を解析した。その結果, ノックダウンマウスでは BFU-E が異常に蓄積していたことから, GATA-1 は BFU-E から CFU-E への分化にも重要であることが示された。

(考 察)

今回の解析から, *Gata1* 遺伝子はそれぞれの分化段階において特異的な制御をうけていることが考えられた。そこで, 今後は今回確立した系を用いて, G1HE core 以外の領域も解析することによって, *Gata1* 遺伝子制御の全体像を明らかにしたいと考えている。さらに, ノックダウンマウスの解析から GATA-1 が早期分化段階においても, 重要な役割を果たしていることが初めて明らかになった。このノックダウンマウスは白血病を発症することが知られており, この早期段階での機能が白血病抑制に重要である可能性がある。今後は, この段階での GATA-1 の標的遺伝子を探索することにより, さらに詳細な GATA-1 の機能解析を進めていく予定である。

(結 論)

G1HE core 領域 (特に GATA 結合配列) は BFU-E および赤芽球における *Gata1* 遺伝子の発現に必要である。また, BFU-E における GATA-1 の発現は CFU-E への分化に重要である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は, 造血の分子メカニズムを転写因子 GATA1 の発現を指標として, マウス個体レベルで, 緻密に解析したものであり, その成果は, 基礎医学分野のみならず, 血液内科学などの臨床医学分野においても有用であり, 価値の高いものである。そして, 著者がこの研究分野において, しっかりとした実験手法を習得していることが伺えた。

著者は, 「転写因子による造血制御」という進歩の大変早い研究分野において, 最新の文献に至るまでよく勉強し, 大変しっかりした知識を有し, 審査員との間に, 活発かつ有意義な討論が行うことができた。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。